



ANEXO 1

FORMATO PARA LA PRESENTACIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN
CON EL FINANCIAMIENTO DEL FEDU

1. Título del proyecto

**ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE FERMENTACION ALCOHÓLICA ASISTIDA POR
ULTRASONIDO A DIFERENTES NIVELES DE POTENCIA PARA LA OBTENCION DE
VINO DE ISAÑO (*Tropaeolum tuberosum*)**

2. Área de Investigación

Área de investigación	Línea de Investigación	Disciplina OCDE
INGENIERIA DE PROCESOS	DESARROLLO DE PRODUCTOS Y PROCESOS	

3. Duración del proyecto (meses)

12 MESES

4. Tipo de proyecto

<u>Individual</u>	<input checked="" type="radio"/>
<u>Multidisciplinario</u>	<input type="radio"/>
<u>Director de tesis pregrado</u>	<input type="radio"/>

4. Datos de los integrantes del proyecto

Apellidos y Nombres	COLOMA PAXI
Escuela Profesional	ALEJANDRO
Celular	973875013
Correo Electrónico	a_coloma_p@hotmail.com

- I. Título (El proyecto de tesis debe llevar un título que exprese en forma sintética su contenido, haciendo referencia en lo posible, al resultado final que se pretende lograr. Máx. palabras 25)

**CINÉTICA DE FERMENTACION ALCOHÓLICA ASISTIDA POR ULTRASONIDO A
DIFERENTES NIVELES DE POTENCIA PARA LA OBTENCION VINO DE ISAÑO
(*Tropaeolum tuberosum*)**

- II. Resumen del Proyecto de Tesis (Debe ser suficientemente informativo, presentando -igual que un trabajo científico- una descripción de los principales puntos que se abordarán, objetivos, metodología y resultados que se esperan)

El objetivo del presente trabajo de investigación es evaluar la cinética de fermentación alcohólica asistida por ultrasonido de pulpa hidrolizada de tres genotipos de isaño (*Tropaeolum tuberosum*) con *Saccharomyces cerevisiae*. Las



variables experimentales son: genotipos de isaño (amarilla, morado y amarillos con ojos morados) y potencia de ultrasonido (100W 200W y 300 W). Se evaluarán las propiedades fisicoquímicas (pH, % de ácido, contenido de sólidos solubles y contenido de alcohol y azúcares reductores) y propiedades ópticas. La materia prima se adquirirá de los mercados de la ciudad de Puno. Los procesos a seguir son: Recepción, selección, lavado, cocción, pulpeado, dilución, digestión enzimática, acondicionado, fermentación, filtrado y envasado. El proceso de fermentación se realizará en un bioreactor de capacidad de 1L asistida por ultrasonido. Los experimentos son conducidos bajo el diseño completo al azar. De los resultados se espera que el genotipo de isaño y la potencia del ultrasonido afectara en los parámetros cinéticos de la fermentación alcohólica y su propiedades de vino de isaño.

III. Palabras claves (Keywords) (Colocadas en orden de importancia. Máx. palabras: cinco)

Isaño, fermentación alcohólica, ultrasonido, hidrólisis enzimática, cinética.

IV. Justificación del proyecto (Describa el problema y su relevancia como objeto de investigación. Es importante una clara definición y delimitación del problema que abordará la investigación, ya que temas cuya definición es difusa o amplísima son difíciles de evaluar y desarrollar)

La región alto andina cuenta con una biodiversidad importante para el uso del hombre en su alimentación, su salud y su cultura. Cada piso ecológico andino tiene su propio ecosistema que permite desarrollar a diferentes especies de flora y fauna con características peculiares según su hábitat; algunos de estas especies presentan los valores nutritivos y medicinales para el ser humano, los mismos que han sido utilizados en su alimentación por los pobladores altoandinos desde los tiempos ancestrales. Una de las especies que ha tenido mayor relevancia en las comunidades altoandinas fue el isaño, un tubérculo originario de los andes, que pertenece a la familia Tropaeolaceae, caracterizado por su sabor picante. Sin embargo, cuando se expone al sol se vuelve dulce y se convierte apto para el consumo. Los pobladores de estos lugares utilizan como parte de su alimentación y como medicina contra la próstata, anemia, inflamación, entre otros. Estas propiedades medicinales estarían dadas por su contenido de compuestos bioactivos, en especial los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante, son considerados compuestos con efectos preventivos sobre enfermedades de origen inmunológico o cardíaco, dichos compuestos en los últimos tiempos están siendo muy estudiadas. Por otro lado, existen estudios sobre algunas genotipos de isaño con buenas cantidades de carotenos, antocianinas y otros pigmentos.

V. Antecedentes del proyecto (Incluya el estado actual del conocimiento en el ámbito nacional e internacional. La revisión bibliográfica debe incluir en lo posible artículos científicos actuales, para evidenciar el conocimiento existente y el aporte de la Tesis propuesta. Esto es importante para el futuro artículo que resultará como producto de este trabajo)

Choi et al., (2015), estudió el efecto de un ultrasonido indirecto 'tipo baño' en la fermentación de cerveza hecha de cebada coreana de seis hileras. Las muestras de cerveza fueron tratadas en un baño de ultrasonidos durante 4 días durante la fermentación primaria. La frecuencia del ultrasonido fue de 40 kHz, y la potencia de entrada se ajustó a 120, 160 y 200 W. Se realizó



tratamiento ultrasónico durante 2, 6 y 12 h para cada entrada energía. Se midieron las propiedades fisicoquímicas y sensoriales, así como la calidad de las cervezas. La Ultrasonificación mejora la producción de etanol en un 13,18 % a 160 W. En vista de los beneficios potenciales de la ultrasonificación y la reducción del tiempo de preparación, por lo que se justifican más estudios en esta área.

Al Daccache et al., (2020) estudió el impacto del ultrasonido de baja intensidad (US) en *Hanseniaspora* sp. fermentaciones de levadura asistida por US de jugo de manzana. Primero evaluó el efecto de la duración del pulso y la fase de crecimiento en la aplicación de US utilizando un medio sintético. La duración óptima del pulso de US en la tasa de crecimiento de la levadura fue de 0,5 s seguido de un período de descanso de 6 s, y durante 6 h de las fases Lag y Log. El impacto de la US también dependía de la fase de crecimiento, mostrando una mayor sensibilidad de la levadura a la US durante la fase Lag en lugar de la fase Log. La fermentación de jugo de manzana asistida por US mostró un aumento significativo en el crecimiento de la biomasa y el consumo de glucosa, junto con una disminución significativa en el rendimiento de etanol. La cinética de crecimiento más rápida (en un 52 %) y la mayor reducción de etanol (en un 0,55 % (v, v) se obtuvieron para el tratamiento durante las primeras 12 h de fermentación, por lo que la fase estacionaria alcanzó más rápido y el máximo, la tasa de crecimiento de la biomasa que fue 10 veces mayor en comparación con el cultivo no tratado. Los resultados obtenidos en este estudio demostraron la eficiencia prometedora de la fermentación asistida por US para estimular el crecimiento de la biomasa y reducir el contenido de etanol en las bebidas alcohólicas.

Zhang et al., (2019), evaluó las influencias de los tratamientos ultrasónicos con diferentes modos de trabajo (fijo frecuencia y frecuencia de barrido) y varias frecuencias en el crecimiento bacteriano y rendimiento del metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) fueron investigados por empleando una ranura de irradiación ultrasónica in situ junto con una fermentación en matraz equipo. Los resultados revelaron que el tratamiento ultrasónico in situ podría promover el crecimiento bacteriano y rendimiento del metabolismo, y el efecto del ultrasonido de frecuencia fija (FF) fue mayor que el ultrasonido de frecuencia de barrido (SF). El contenido de metabolitos en el caldo de fermentación aumentó con FF y disminuyó después de los tratamientos con SF. En el otro lado, cuando la frecuencia de FF era superior a 33 kHz, el crecimiento de *S. cerevisiae* se debilitó y la tasa de mortalidad de *S. cerevisiae* aumentó en el caldo de fermentación. En FF de 23 kHz y 48 h de tiempo de fermentación, el contenido de etanol aumentó en 19.33 %, y el también aumentó el contenido de γ -feniletanol y otros metabolitos volátiles como los ésteres. En conclusión, FF podría mejorar significativamente el crecimiento de *S. cerevisiae*, y el FF de 23 kHz mostró el impacto óptimo en el proceso de fermentación de *S. cerevisiae*. de 20-30 kHz para mejorar la fermentación de etanol a partir de melaza.

Klomklieng and Prateepasen (2012), utilizó ultrasonido de baja potencia en el rango La fermentación se realizó a temperatura ambiente y se controló en tiempo real el medioambiente a través del pH y la temperatura del líquido, así como la producción de etanol. Los resultados indicaron que la energía ultrasónica mejoró la tasa de producción de etanol al reducir el tiempo de fermentación entre 6 y 9 h en comparación con el uso del biorreactor de control. La producción de etanol aumentó en proporción al aumento de la potencia ultrasónica. Las concentraciones máximas de etanol al 13,8 %, 15,6 % y 13,1 % se lograron con energía ultrasónica suministrada a 20, 25 y 30 kHz, respectivamente, mientras que el sistema de control fue del 12,0 %. La tasa de producción de etanol máxima específica más alta (1,55 h⁻¹) se logró a 25 kHz en un ambiente normal con pH 4,6-5,0 y temperatura del líquido 30-38 °C. Cabe señalar que la estimulación de energía ultrasónica continua a 25 kHz fue el nivel óptimo para mejorar el rendimiento de la fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* M30. a 30 kHz, se observó que el



aumento de la temperatura ambiental provocaba una disminución en la tasa de producción de etanol durante la fermentación prolongada.

VI. Hipótesis del trabajo (Es el aporte proyectado de la investigación en la solución del problema)

La genotipo de isaño y potencia de ultrasonido afectará significativamente sobre los parámetros cinéticos de fermentación y las características fisicoquímicas de la bebida fermentada a base de isaño.

VII. Objetivo general

Determinar el efecto de la variedad de isaño y potencia de ultrasonido sobre los parámetros cinéticos de fermentación y las características fisicoquímicas de la bebida fermentada a base de isaño.

VIII. Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la variedad de isaño y potencia de ultrasonido sobre los parámetros cinéticos de fermentación de isaño.
- Evaluar el efecto de la variedad de isaño y potencia de ultrasonido sobre las características fisicoquímicas de la bebida fermentada a base de isaño.
- Determinar el modelo matemático que ajusta mejor los parámetros cinéticos.

IX. Metodología de investigación (Describir el(los) método(s) científico(s) que se empleará(n) para alcanzar los objetivos específicos, en forma coherente a la hipótesis de la investigación. Sustentar, con base bibliográfica, la pertinencia del(los) método(s) en términos de la representatividad de la muestra y de los resultados que se esperan alcanzar. Incluir los análisis estadísticos a utilizar)

METODO EXPERIMENTAL

DIAGRAMA DE FLUJO DE OPERACIONES.

Para la realización del presente trabajo de investigación se utilizará el siguiente diagrama de flujo.

Diagrama de flujo de fermentación alcohólica de isaño.

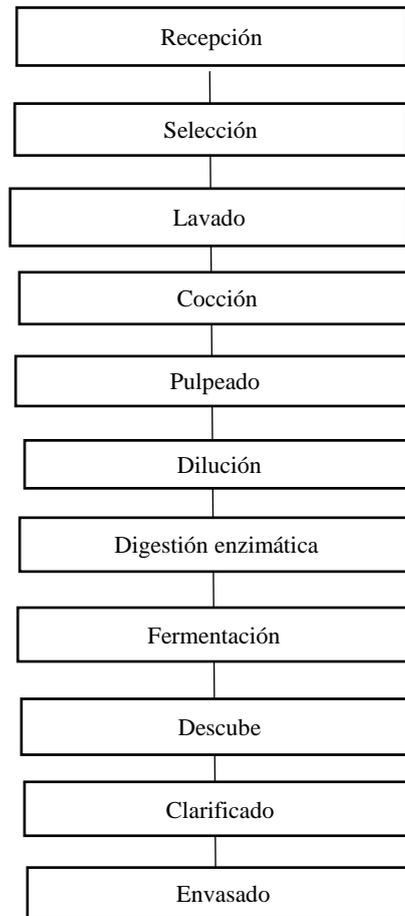


Figura N°01. Diagrama de flujo de fermentación alcohólica de isaño

Descripción de diagrama de flujo de operaciones.

A continuación, se hace la descripción del proceso, la cual consiste en las siguientes operaciones:

Recepción: Se recepcionará la materia prima de Isaño (amarillo, morado, amarillo- morado).

Selección: Se seleccionará los tubérculos de Isaño que no presenten daño en su estructura física.

Lavado: Se realizará para eliminar las impurezas utilizando agua con solución de hipoclorito de sodio a 200 ppm.

Cocción: Se someterá a cocción a temperatura de ebullición del agua.

Pulpeado: Tiene como finalidad romper la estructura de la isaño, esto debe ser suficiente para poder extraer y separar el zumo.

Dilución: La dilución se realizará en una proporción de mezcla de 200 g/L.

Digestión enzimática: Se adicionará la enzima α -amilasa a una concentración de 0.25 g/L de suspensión y enzima amiloglucosidasa (AMG) a una concentración de 0,01 g/L de suspensión.

Acondicionado: Incorporación de levadura de 0.5g/100ml, ph 3,6 y 13°Brix para que empiece la fermentación de la pulpa de la isaño.

Fermentación: Este proceso se realizará durante 4 días a 20°C analizando el almacenamiento.

MÉTODOS DE ANÁLISIS.***Cinética de fermentación***

Determinación de la cinética de crecimiento. La cinética de crecimiento se seguirá midiendo la densidad óptica y contando el número de células:

Densidad óptica. Se tomarán las muestras periódicamente del biorreactor y se determinaron sus valores de absorbancia a 600 nm usando un espectrofotómetro de UV visible (Biobase, China).

Recuento celular. Las muestras se diluirán varias veces en agua y las células se contaron usando una cámara de recuento de células Thoma (Preciss, Francia). Para detectar las células viables, las muestras se mezclaron con una solución de azul de metileno al 0,01% v / v. La concentración de biomasa X (células · mL⁻¹).

Determinación de azúcares reductores

Las azúcares reductores serán analizados de acuerdo al procedimiento descrito por Ochoa (Ochoa et al., 2013) con algunas modificaciones. Los ensayos se realizarán preparando una mezcla de reacción con 0.5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) y 15 g de tartrato doble de sodio-potasio, disueltos en 25 ml de agua destilada caliente. Inmediatamente, se adicionarán 10 ml de hidróxido de sodio 2 N y se aforará a un volumen de 50 ml con agua destilada y se almacena en un frasco ámbar a 4°C. Una suspensión de 1.5 ml de las mosto fermentado de mashua se mezclará con 2 ml de NaOH 2 N y se incubará en baño maría por 15 min, para la obtención una lisis alcalina. Posteriormente, se mezclará una alícuota de 0.5 ml de la lisis alcalina con 0.5 ml de la solución de DNS. La mezcla se incubará por 10 min en baño maría y se leerá con el espectrofotómetro a 600 nm. Se preparó la solución patrón de Glucosa a las siguientes concentraciones: 0.5, 0.7, 0.9, 1.1, 1.3, 1.5, 1.7 y 1.9 g/L. Se desarrolla la reacción con el reactivo DNS (Bello GiL et al., 2006).

Determinación de la cinética de producción de etanol

Las muestras tomadas en diferentes momentos de los procesos de fermentación se centrifugaran a 4000 rpm durante 10 min para eliminar las suspensiones de levadura y las partículas de las partículas. El contenido de etanol se determinará mediante medidas de densidad utilizando un picnómetro de vidrio de 5 mL (Thermo Fisher, Francia).

Cálculo de parámetros cinéticos

La tasa de producción de etanol y ($g_{\text{etanol}} \cdot g_{\text{biomasa}}^{-1} \cdot h^{-1}$), el rendimiento de biomasa $Y_{X/S}$ ($g_{\text{biomasa}} \cdot g_{\text{substrato}}^{-1}$) y el rendimiento de producto $Y_{P/S}$ ($g_{\text{etanol}} \cdot g_{\text{substrato}}^{-1}$) se calcularon de acuerdo con Ecs. (1), (2) y (3), respectivamente.

$$Y_{X/S}(g_{\text{biomasa}} - g_{\text{substrato}}^{-1}) = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (1)$$

$$Y_{P/S}(g_{\text{etanol}} - g_{\text{substrato}}^{-1}) = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad (2)$$

$$\gamma(g_{\text{etanol}} - g_{\text{biomasa}}^{-1} \cdot h^{-1}) = \frac{P_f - P_0}{X(t_f - t_0)} \quad (3)$$

Donde X_0 y X_f son las concentraciones de biomasa inicial y final respectivamente, P_0 y P_f son las concentraciones de etanol inicial y final respectivamente, y S_0 y S_f son las concentraciones de sustrato inicial y final respectivamente.



ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Objetivo 1: Los datos serán analizados con diseño bloque completamente al azar para cada variedad de isaño. Los valores promedios serán calculados por dos diferencias significativas cuando $p < 0.05$

Factores de estudio: Variedad de isaño (amarillo, morado, amarillo-morado), potencia de ultrasonido (100, 200, 300 W).

Variables de respuesta: Contenido de alcohol, concentración de levadura, azúcares reductores, sólidos solubles.

Objetivo 2: Los datos serán analizados con diseño completamente al azar con arreglo factorial 3x3 con 3 repeticiones. Los valores promedios serán calculados por dos diferencias significativas cuando $p < 0.05$.

Factores de estudio: Variedad de isaño (amarillo, morado, amarillo-morado), potencia de ultrasonido (100, 200 y 300 W)

Variables de respuesta: Densidad (g mL^{-1}), pH, SS ($^{\circ}\text{Brix}$), AT (meq L^{-1}), AV (meq L^{-1}), DAL (mg L^{-1}), DAT (mg L^{-1}), Extracto seco (mg L^{-1}), Contenido de alcohol (% v/v), Color y ácido ascórbico.

X. Referencias (Listar las citas bibliográficas con el estilo adecuado a su especialidad)

- Al Daccache, M., Koubaa, M., Salameh, D., Maroun, R. G., Louka, N., & Vorobiev, E. (2020). Ultrasound-assisted fermentation for cider production from Lebanese apples. *Ultrasonics Sonochemistry*, 63(October 2019), 104952. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104952>
- Bello Gil, D., Carrera B., E., & Diaz M., Y. (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. *Icidca*, 40, 45–50.
- Choi, E. J., Ahn, H., Kim, M., Han, H., & Kim, W. J. (2015). Effect of ultrasonication on fermentation kinetics of beer using six-row barley cultivated in Korea. *Journal of the Institute of Brewing*, 121(4), 510–517. <https://doi.org/10.1002/jib.262>
- Klomklieng, W., & Prateepasen, A. (2012). Molasses fermentation to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* M30 using low ultrasonic frequency stimulation. *KKU Research Journal*, 17(6), 950–957.
- Ochoa, S. A., López-Montiel, F., Escalona, G., Cruz-Córdova, A., Dávila, L. B., López-Martínez, B., Jiménez-Tapia, Y., Giono, S., Eslava, C., HernándezCastro, R., & Xicohtencatl-Cortes, J. (2013). Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México*, 70(2), 138–150.
- Zhang, Z., Xiong, F., Wang, Y., Dai, C., Xing, Z., Dabbour, M., Mintah, B., He, R., & Ma, H. (2019). Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* in a one liter flask coupled with an external circulation ultrasonic irradiation slot: Influence of ultrasonic mode and frequency on the bacterial growth and metabolism yield. *Ultrasonics Sonochemistry*, 54(February), 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.02.017>

XI. Uso de los resultados y contribuciones del proyecto (Señalar el posible uso de los resultados y la contribución de los mismos)

Los resultados obtenidos de este proyecto de estudio, podrán ser útiles para ser referenciados en la formulación de alimentos por su alto contenido de compuestos



fenólicos y capacidad antioxidantes. Además de los alimentos este puede ser una opción para la elaboración de licores y que cumplan beneficios extras

XII. Impactos esperados

i. Impactos en Ciencia y Tecnología

Se optimizará los parámetros cinéticos de fermentación alcohólica y sus características fisicoquímicas de isaño.

ii. Impactos económicos

Generar nuevas oportunidades, para aprovechar mejor nuestros recursos naturales y darle un valor agregado, de tal forma generar la opción de implantar una industria productora y comercializadora de compuestos bioactivos

iii. Impactos sociales

Con la investigación, estudio y aprovechamiento de nuestros recursos naturales podemos contribuir y fomentar mejor la producción de estos recursos para su mejor aprovechamiento

iv. Impactos ambientales

La isaño es un cultivo adaptable a las tierras de la región de Puno, por lo que no necesita parcialmente de pesticidas y fertilizantes, se da a considerar uno de los productos orgánicos. De tal forma el método de la fermentación es uno de los métodos que menos contamina ya que el proceso es anaerobio. Y la separación de los sólidos puede ser aprovechable para el desarrollo de composta y fertilizante natural para los cultivos

XIII. Recursos necesarios (Infraestructura, equipos y principales tecnologías en uso relacionadas con la temática del proyecto, señale medios y recursos para realizar el proyecto)

Infraestructura

- Laboratorios de la E.P.I. agroindustrial de la Una-Puno.
- Laboratorio de la Universidad San Antonio Abad del Cusco.

b) Equipos

- a) Reactor
- b) Balanza analítica
- c) Espectrofotómetro
- d) Contador de colonias
- e) Refractómetro
- f) Termómetro
- g) Picnómetro

c) Materiales

- a) Tubos de ensayo
- b) Buretas
- c) Pipetas volumétricas
- d) Probetas de 50, 100 y 500 ml
- e) Vasos precipitados
- f) Recipientes de vidrio ámbar y herméticos



g) Cronometro
h) Contenedores
i) Adhesivos para rotular
d) Reactivos
- Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)
- Tartrato doble de sodio-potasio
- Hidróxido de sodio
- Agua destilada

XIV. Localización del proyecto (indicar donde se llevará a cabo el proyecto)

El trabajo de investigación se ejecutará en el laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano, ubicado en la ciudad de Puno a una altitud de 3827 m.s.n.m.

XV. Cronograma de actividades

Actividad	Meses											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Pruebas definitivas	X	X	X									
Ejecución del proyecto de investigación				X	X	X						
Análisis de datos							X	X	X			
Redacción del informe									X	X	X	
Presentación del informe												X

XVI. Presupuesto

Descripción	Unidad de medida	Costo Unitario (S/.)	Cantidad	Costo total (S/.)
Transporte	global	300.00	2	600.00
Impresiones	unidad	1.00	300	300.00
Fotocopias	unidad	1.00	150	150.00
Material de escritorio	Unidad	100	1	100.00
Recolección de información	Unidad	100	1	100.00
Material informativo	Unidad	100	1	100.00
Análisis fisicoquímicos	muestra	100.00	10	1000.00
Imprevistos (%)				235.00
TOTAL				2385.00